

원저

## 鹿茸藥鍼液의 DNA chip을 이용한 遺傳子 發顯 分析

한상원 · 서정철 · 이윤호\* · 최제용\*\*

경산대학교, 경희대학교\* 한의과대학 침구학교실.

\*\*경북대학교 의과대학 생화학교실

### Abstract

#### Gene Expression Analysis Using cDNA Microarray Assay by Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal Acupuncture

Han Sang-won, Seo Jung-chul, Lee Yun-ho\* and Choi Je-yong\*\*

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,  
Kyung-San University, \*Kyung-Hee University,  
\*\*Department of Biochemistry,  
College of Medicine, Kyung-Pook University

**Objective** : Bone homeostasis is maintained by balance of bone formation and resorption. Therefore, bone related diseases arose by disturbance of this balance between osteoblast and osteoclast activities. To develop a successful screening system the therapeutic components based on oriental medicine is essential to set up systematic approach for that purpose. The purpose of this study is to know the gene expression using cDNA microarray assay.

**Methods** : Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture extract was prepared by boiling. Human osteosarcoma cells(HOS) were treated with Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal acupuncture solution. Then mRNA was extracted and cDNA microarray assay was performed.

**Results** : Human osteosarcoma cells(HOS) treated with Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture solution(500 $\mu$ g/ml) showed that thioredoxin, TAFII31 and two novel genes were increased. However many genes decreased their expression by Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture.

- 접수 : 2003년 3월 25일 · 수정 : 2003년 4월 25일 · 채택 : 2003년 5월 17일  
· 교신저자 : 서정철, 경북 구미시 송정동 458-7 경산대학교 부속구미한방병원 침구과  
Tel. 054-450-7707 E-mail : acumox@hanmail.net

**Conclusions** : This type of approach will give a good chance to explore the favorable effects of Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture. Further study is needed for investigating the effect of Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture.

**Key words** : Cervi Pantotricuhum Cornu, Herbal Acupuncture, Gene Expression, cDNA Microarray Assay

## I. 緒 論

人體의 骨은 形成(bone modeling)과 再形成(bone remodeling) 過程을 통하여 그 恒常性을 유지하게 된다. 骨의 形成은 태생기부터 시작하여 골격이 성숙 되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속된다. 이 시기는 骨芽細胞의 활동으로 인한 骨形成이 破骨細胞의 活動으로 인한 骨吸收보다 훨씬 많게 되는 시기이다. 骨의 再形成은 이미 성장이 끝난 후 오래된 骨을 제거하고 다시 새로운 骨로 대체되는 과정을 말하며, 骨芽細胞와 破骨細胞의 작용을 이룬 骨의 再形成을 통하여 그 恒常성이 유지된다. 이러한 기전은 골 개조 단위(bone remodeling unit)라는 국소부위에서 일어나는데<sup>1)</sup>, 신체 전반적으로 영향을 미치는 systemic factors들도 중요한 역할을 한다<sup>2)</sup>.

최근 分子生物學의 눈부신 발달과 더불어 骨形成에 많은 遺傳子들이 重要한 役割을 하는 것으로 알려지고 있고, 이러한 遺傳子들의 調節物質이 骨疾患 치료제로서의 가능성을 높이고 있다. 따라서 인간게놈 프로젝트가 끝나면 여러가지 유전자들의 조절을 이용한 약물 개발이 활발히 진행될 것으로 예상되며, 韓醫學의 지식을 바탕으로 각종 질환에 대한 치료 가능한 물질의 체계적인 검색은 미래의 生命科學 分野에 중요한 연구 전략으로 생각된다<sup>4)</sup>. 이를 위하여 각종 질환 또는 약재 개발에 필요한 실험 모델을 개발

하고, 나아가 그 모델로 찾고자 하는 물질들을 검색할 수 있는 방법을 알아내어 최종적으로 검색된 물질의 效能을 分析·評價할 수 있는 체계를 갖추는 것이 필수적이다.

骨에 대한 研究로는 骨多孔症<sup>5)-8)</sup>, 骨折<sup>9)-12)</sup> 등에 대한 報告가 있었으나, 骨形成 과정시에 일어나는 여러 遺傳子의 發顯에 관한 分子生物學的인 研究가 미비한 실정이다. 이에 著者는 補氣血·強筋骨·益精髓의 效能을 지니고 있는 鹿茸으로 藥鍼液을 만든 후, 骨 關聯 人體 遺傳子 發顯 樣相에 미치는 影響을 알아보고자 DNA chip을 利用하여 研究한 結果를 報告하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 鹿茸藥鍼液의 調製

鹿茸 80g에 蒸溜水 700ml를 넣은 다음, 80℃에서 3시간 동안 熱湯處理하여 抽出된 液을 rotary evaporator에서 減壓 濃縮하였다. 濃縮된 液體를 凍結 乾燥하고 乾燥器에서 24시간 이상 放置하여 粉末로 만들어, 試料로 사용할 때마다 500μg/ml를 buffer에 녹여 減壓滅菌하여 使用하였다.

### 2. 細胞培養

骨芽細胞는 human osteosarcoma(HOS) cell(A

TCC Co., USA)을 사용하였고, 培養은 10% fetal bovine serum(FBS)(Gibco, Gland Island, NY, USA), penicillin(100U/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml)이 混合된 dulbecco's modified eagle media (DMEM) 배지에 5×10<sup>5</sup>cell/ml 되게 接種하여 5% CO<sub>2</sub> 상태가 유지되는 37°C incubator에서 培養하였다. 冷凍乾燥된 鹿茸藥鍼 抽出物을 물에 녹인 후 비수용성 물질을 원심분리기로 침전하여 제거한 후 250µl의 상청액을 세포에 첨가하여 0.5mg/ml 濃도가 되게 하였다. 細胞 數는 肉眼으로 보았을 때 密生狀態가 되게 한 후 배지에 藥鍼液을 注入하고 24시간 培養하였다.

### 3. cDNA microarray 製作

본 실험에서는 경북대학교 의과대학 면역학교실에서 제작한 사람의 DNA 3K chip을 이용하였으며, 이를 간략하게 기술하면 다음과 같다. 기질세포 유전자 은행이 보유하고 있는 3,000종의 cDNA를 대상으로 C6 amine modified T3(5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3') primer 와 C6 amine modified T7(5'-GTAATACGACTTCACTATAGGGC-3') primer를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 시행한 후 sodium acetate와 ethanol을 첨가하여 PCR product를 침전, 건조시키고 일정량의 3× standard saline citrate(SSC)에 녹였다. PCR 조건은 0.2µM 각 primer, 2.5 Utaq DNA polymerase (promega), 0.2mM dNTPs(Amershan Pharmacia Biotech, USA)을 넣어 94°C에 60초, 57°C에 90초 35 cycle 돌린 후 72°C에서 120초 extension시켰다. 이를 amino-silane으로 코팅된 glass slide(CM T-GAPSTM coated slides)(Corning Inc.)에 Cartesian Co.의 PixSYS 5,500 arrayer를 사용하여 print한 후 며칠간 진공상태에서 건조시켰다. 그후 0.2% sodium dodecyl sulfate(SDS)로 2분간, 중류수로 2분간 세정 후 2분간 끓여 DNA를 변성시킨 후

상온에서 slide를 건조하였다. 그후 sodium borohydride 용액(1.0g of NaBH<sub>4</sub>, 300ml of PBS, 100 ml of ethanol)에 5분간 상온에서 세정하고 0.2% SDS 용액으로 각 1분씩 3번 세정 후 최종 1분간 중류수로 세척하고 변성시킨 후 보관하였다.

## 4. RNA 抽出

### 1) total RNA(tRNA) 抽出

正常細胞와 鹿茸 藥鍼液을 處理한 細胞를 PBS로 두번 씻은 후 tRNA를 다음과 같이 추출하였다. Trizol 용액(Gibco, BRL, USA)을 각 petridish에 1ml씩 넣어 상온에 10분 방치하였다. RNA가 녹은 Trizol 용액을 돌려가면서 회수하여 1.5ml E-tube에 넣은 다음, 1-bromo-3-chloropropane 200 µl를 첨가하고 1분간 진탕한 후 얼음에 넣어 층이 분리될 때까지 두었다. 시료를 원심분리기로 침전(14,000 rpm, 20 min., 4°C)한 후 상청액을 다른 tube에 넣고 같은 양의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C에 2시간 이상 둔 후, 이들을 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리하고 pellet을 75% ethanol로 씻고 공기 중에서 건조시켜 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 중류수에 녹였다. 모두 10% formamide agarose gel에 전기영동시켜 18S 28S ribosomal RNA band를 확인하였다.

### 2) messenger RNA(mRNA) 抽出

위와 같이 분리한 tRNA로 oligotex mRNA midi kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 mRNA를 다음과 같이 분리하였다. 먼저 250µl에 녹인 tRNA를 250µl binding buffer(OBB) 완충액과 30µl Oligotex suspension을 넣고 혼합하여 RNA를 70°C에 3분간 두어 2차 구조가 형성되지 않도록 하였다. 그 후 상온에서 10분간 두어 bead의 dT와 mRNA의 poly A가 결합하도록 하였다. 원심분리(15,000rpm, 2min.)한 후 상청액을 제거하고 600µl wash buffer

(OW2) 용액을 넣어 spin column에 옮겨 다시 원심 분리(15,000rpm, 1min.)한 후, 500 $\mu$ l OW2 용액을 넣어 한번더 시행하였다. Spin column에 100 $\mu$ l의 70 $^{\circ}$ C elution buffer(OEB) 완충액을 넣어 잘 혼합한 후 다시 원심분리하였으며, 이상의 과정을 2회 반복 시행하였다. 22 $\mu$ l의 2M sodium acetate(pH4.0)와 550 $\mu$ l의 ethanol을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에 12시간 두었다. 원심분리 후 상청액을 제거하여 75% ethanol로 씻은 다음 실온에서 건조하였다. 증류수 10 $\mu$ l를 넣어 pellet을 녹이고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 둔 후 그중 1 $\mu$ l를 취하여 ultra violet(UV) spectrophotometer(DU 530, Beckman)로량을 측정하였다.

### 5. 형광 cDNA probe 製作

DeRiSi JL 등<sup>13)</sup>이 기술한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 2 $\mu$ g의 mRNA과 2 $\mu$ g oligo-dT를 먼저 70 $^{\circ}$ C에 10분간 방치한 후 얼음에 보관하였다. 여기에 2 $\mu$ l Superscript II reverse transcriptase(200 U/ $\mu$ l, Gibco, BRL), 3 $\mu$ l 1mM fluorescent nucleotide(Cy5-dUTP ; 鹿茸藥液處理한 mRNA, Cy3-dUTP ; HOS cell mRNA)(Amersham), 3 $\mu$ l 10 $\times$ dNTP mix(5mM dATP, dCTP, dGTP & 2mM dTTP) 등을 가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 역전사시키고 1.5M sodium hydroxide 1 $\mu$ l와 30mM EDTA 1 $\mu$ l를 넣어 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 반응을 중지시켰다. 反應液은 Microcon 30(Milipore)을 사용해서 농축시키고 Cy3-probe와 Cy5-probe를 혼합한 후 3 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 0.5mg/ml yeast tRNA, 0.5mg/ml poly A blocker가 되게 하였다.

### 6. Microarray Hybridization

사람의 3K chip slide를 10mg/ml bovine serum albumine(BSA), 3.5 $\times$ SSC, 0.1% SDS 용액에 넣어 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 prehybridization한 후 蒸溜水와 isopropanol에 순서대로 水洗하고 500rpm에서

5분간 원심분리하여 slide를 건조시켰다.

準備된 probe를 99 $^{\circ}$ C에서 2분간 끓이고 잠시 원심분리하여 사람의 3K chip slide에 점적하고 cover slide를 덮어 hybridization cassette(Corning Inc.)에 50 $^{\circ}$ C에서 16~20시간 hybridization 후 slide를 상온에서 0.1 $\times$ SSC/0.1% SDS에 한번, 0.1 $\times$ SSC에 두번 水洗하고 역시 500rpm에서 5분간 원심분리하여 slide를 건조시켰다.

### 7. Scanning과 分析

Laser confocal microscope이 달린 scanarray 4,000(GSI Lumonics)을 사용하여 Cy3와 Cy5의 경쟁적 결합에 의한 상대적 발현수치를 測定하고 Quantarray software(GSI Lumonics)를 이용하여 각 이미지를 合成하고 分析하여 遺傳子別 發顯 比率(Cy5/Cy3 ratio, red와 green의 intensity ratio ; R/G ratio)을 決定하였다. 結果는 各各의 array에 있는 housekeeping gene인  $\beta$ -actin과 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase(GAPDH)를 利用하여 보정하였다.

## III. 實驗成績

DNA chip 結果 遺傳子 전체 R/G ratio의 分布가 최소 0.06에서 최고 2.06으로 나타났다(Fig. 1, Fig. 2). 正常組織보다 鹿茸藥液 培養組織에서 發顯이 2배 이상(R/G ratio $\geq$ 2) 增加된 遺傳子는 모두 3개였고, 이중 1개는 알려진 遺傳子이고 나머지 2개는 새로운 遺傳子였으며, 거의 2배에 가깝게 增加(R/G ratio $\geq$ 1.97)한 遺傳子도 1개가 있었다. 반면 正常組織보다 鹿茸藥液 培養組織에서 發顯이 2배 이상 減少된(R/G ratio $\leq$ 0.5) 遺傳子는 모두 227개였으

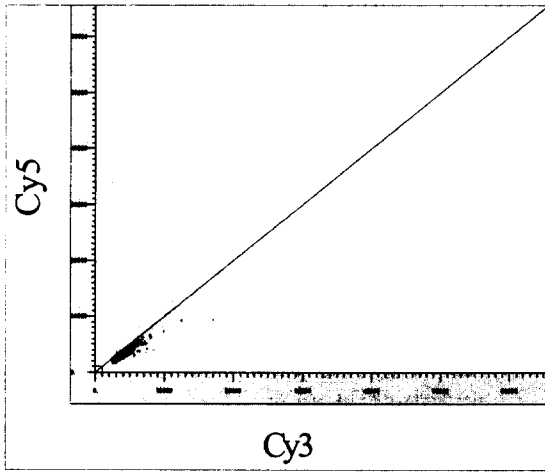


Fig. 1. Scatter plot of microarray test.

All elements exhibiting a minimum level of expression of intensity of >2,500 fluorescent units(on a scale of 0-65,500 fluorescent units). Three cDNA elements were up-regulated( $\geq 2.0$ ) and about 200 elements were down-regulated( $\leq 0.5$ ) after treatment with Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture solution(red spots).

며, 이중 많은 遺傳子가 알려진 遺傳子들이었다. 鹿茸藥鍼液 처리로 增加된 遺傳子 중 알려진 것은 thioredoxin이다. 또다른 遺傳子로는 transcription factor TFIID-TAFII 31로서 약 2배 增加되었다 <Fig. 1, Table 1>. 增加된 遺傳子 중 database에 알려져 있지 않은 2개 遺傳子是 아직 염기서열이 보고되지 않은 새로운 遺傳子였다 <Fig. 3>.

#### IV. 考 察

韓醫學에서는 腎이나 骨髓와 關聯된 有機的 生理作用의 失調로 骨에 病變이 發生한다고 볼 수 있다. 腎은 精을 간직하고 精은 髓를 生하고 髓는 骨을 滋養시키는데 이를 骨生髓라 하고 腎精이 充實하면 髓가 充盛하고 骨格 또한 生長이 堅實하게 되는데, 이는 骨이 腎之府이고 髓는 腎에서 生하니 骨格의 生長

Table 1. Differentially Expressed Genes by Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture Solution

Identification	Clone	Spot location site	Ratio	Accession No.
<b>Increased</b>				
Thioredoxin	K 0391	4 4 2 12	2.06	J 04026
Unknown	P 1845	4 4 14 7	2.02	-
Unknown	M 1185	3 4 12 5	2.01	-
TAFII31	K 0410	4 4 2 13	1.97	U 21858
<b>Decreased</b>				
Crystallin	K 1387	4 2 4 1	0.06	S 45630
Acyo-CoA oxidase	B 0320	2 4 1 7	0.23	U 03254
Adducin 1	M 4350	2 2 6 3	0.24	NM 0011
Growth arrest specific protein	K 0585	4 4 3 3	0.24	L 13720
Unknown	B 1599	2 1 9 13	0.26	-
Insulin like growth factor II	M 3929	4 1 5 10	0.28	X 07868
Prolyl 4-hydroxylase	P 1203	3 2 7 12	0.29	D 49738
LDL receptor	K 1453	1 1 3 14	0.3	AB 009462

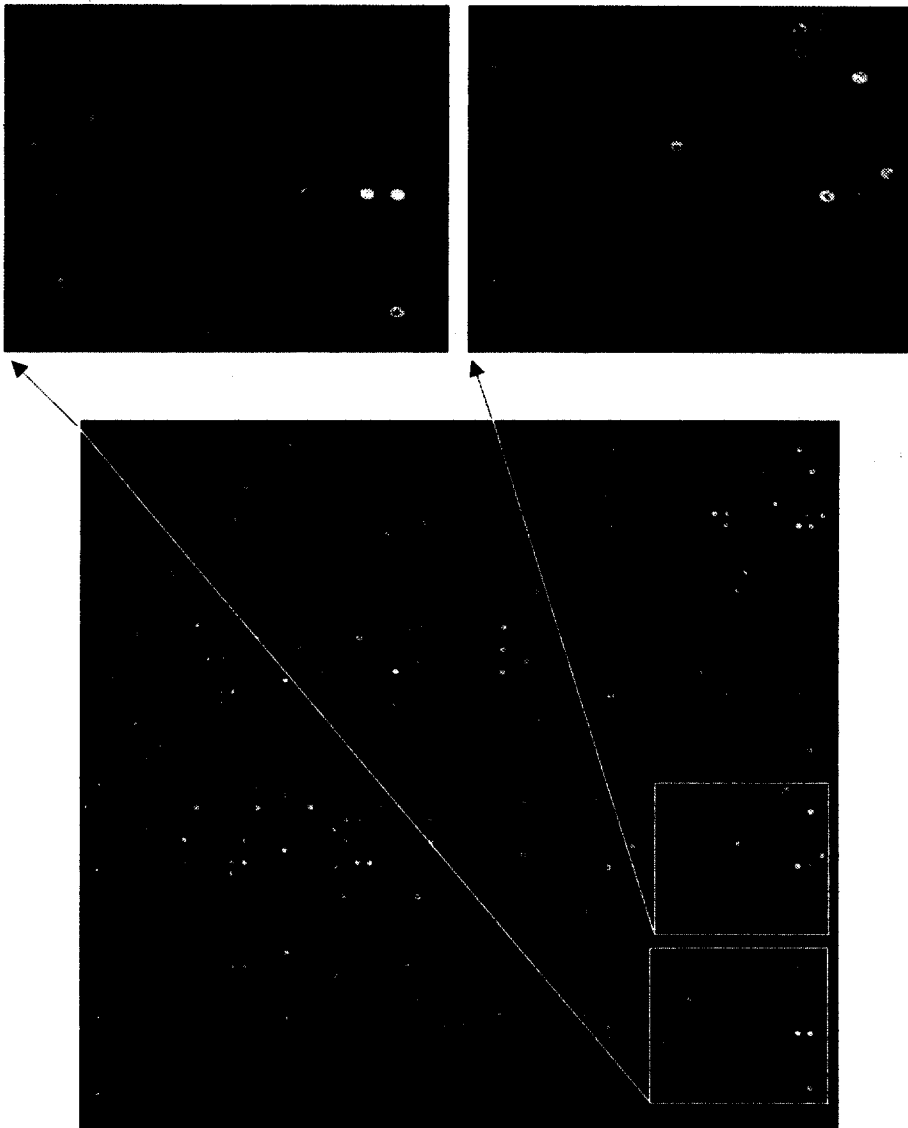


Figure 2. The microarray fluorescence image from a gene expression array tagged with Cy3(un-treated control) and Cy5(treated with Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture).

Confluent HOS cells were treated with Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture solution(500 $\mu$ g/ml) for 24 hours in IMDM supplemented with 10% fetal bovine serum. Control cells were treated with the same media without Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture solution.

The isolation of total RNA and mRNA, probe labeling, prehybridization and scanning were performed as per the manufacturer's instructions. In this image Cy3-dUTP-labeled cDNA is represent as a green signal, and hybridization of Cy5-dUTP-labeled cDNA is represent as a red signal. Arrows indicate typical red signals, which are considered to be highly expressed in Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture solution.

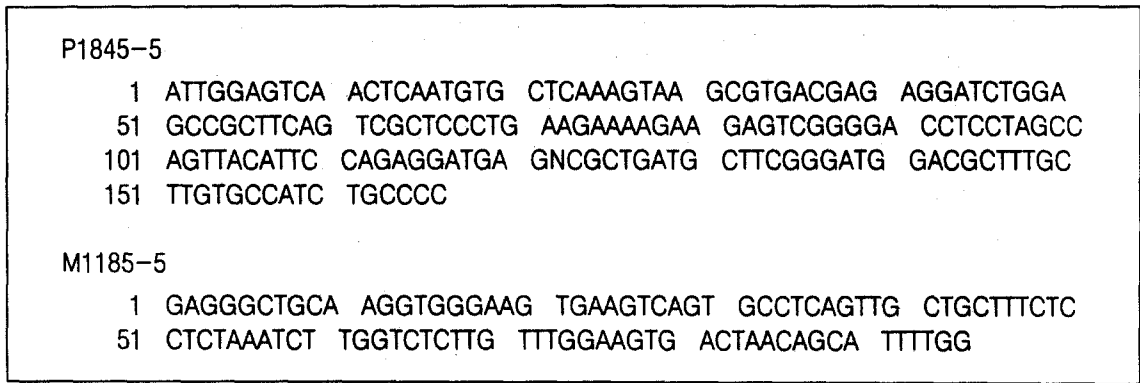


Fig. 3. Nucleotide sequence 2 unknown genes.

Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal-acupuncture solution increased their gene expression in this system.

과 機能은 腎氣의 盛衰에 따라서 결정되고 骨病은 대개 先天稟受가 不足하거나 腎氣가 虛弱한 者에게 많다고 인식하고 있다<sup>14)</sup>.

西洋醫學에서는 骨芽細胞와 破骨細胞의 作用을 통하여 일생동안 骨組織은 계속 破壞되고 再生되는 과정을 겪으면서 恒常性을 維持하게 된다. 骨芽細胞는 미분화된 간엽세포(mesenchymal cell)에서 유래하여 分化되면서 骨을 形成할 수 있는 능력이 부여되는 것으로 알려져 있다. 骨芽細胞의 分化에 대한 여러가지 骨標識因子들의 研究는 잘 알려져 있고 아울러 分子生物學의 발달로 分化의 결정자라 할 수 있는 전사 인자도 알려져 있다. 骨芽細胞의 分化는 다른 細胞의 分化와 같이 細胞 成長이 멈춘 후 骨芽細胞 고유의 기능이 나타나는 것으로 알려져 있다. 즉 骨芽細胞의 特異性은 세포 증식기에서 발현되지 않고 分化되면서 나타나는 것으로 알려져 있다. 지금까지 骨芽細胞 分化 特異的인 遺傳子로 osteocalcin과 bone sialoprotein을 들 수 있다. 이들은 骨組織 特異因子로 잘 알려져 있는 세포외 기질 단백질이다<sup>2)</sup>.

최근 인간게놈프로젝트는 수많은 遺傳子를 찾고 그 기능을 알아내는데 종래의 Southern이나 Northern blotting, PCR(polymerase chain reaction)

을 기본으로 한 subtractive suppressive hybridization(SSH)<sup>15)</sup>, representational difference analysis(RDA)<sup>16)</sup> 그리고 difference display<sup>17),18)</sup> 방법들이 있지만 많은 양의 RNA를 요하며 위양성율이 높아 수많은 인간의 遺傳子를 비교하는데 한계가 있다<sup>19)</sup>. 그러나 최근 DNA chip 기술의 도입으로 이 분야 연구에 획기적인 전기가 마련되었다<sup>20)-24)</sup>.

이러한 분자생물학적 발전은 빠르게 발전하는 전자-기계공학의 발달과 밀접한 연관을 갖는데 이러한 노력으로 아주 작은 공간에(1.8×1.8cm) 수천에서 수만가지의 적은 양의 유전물질을 한꺼번에 고밀도로 심어 놓을 수 있는 DNA chip 기술은 수많은 유전자를 한꺼번에 해독하거나 비교할 수 있게 되었다. 여기에는 두가지의 대표적인 방법이 있는데, 그중 하나는 1995년 스텐포드 대학에서 cDNA를 작은 유리판 위에 고밀도로 심는 cDNA microarray chip을 개발하였고<sup>20)</sup>, 다른 하나는 Affymetrix社에서 20~25개의 염기들로 이루어진 수만개의 oligonucleotide를 심은 oligonucleotide chip 방법<sup>22)</sup>이 그것이다. 이들의 사용 용도는 주로 두 조직간의 유전자 발현양상 비교, 유전자의 염기 서열 분석, 유전자 변이 검색, 특정질환의 진단 뿐만 아니라 약물이나 방사선 치

료후의 변화 등을 추적하여 다양한 분야에서 사용되거나 연구 중이다<sup>13),23)~25)</sup>. 그중 cDNA microarray chip을 이용한 遺傳子 發顯의 비교검색은 두 종류의 서로 다른 조직이나 세포에서 얻은 RNA를 역전사시킬 때 각각 다른 빛을 띠는 형광물질을 붙인 염기를 삽입하여 cDNA를 만들고 이와 같이 합성된 두 개의 cDNA를 동량으로 섞어 이미 알려진 cDNA microarray chip에 경쟁적으로 hybridization시키면 발현이 많이 되는 遺傳子가 가지는 형광 물질의 색깔을 띠게 되어 이것을 레이저 스캐너에 의해 해독하면 두 군간의 遺傳子 發顯樣相을 어느 정도의 질량적 차이까지도 알 수 있게 되었다<sup>13),25)~27)</sup>. 따라서 이러한 방법들은 우리나라의 경우 韓醫學에 그 근거를 두고 약재의 검색을 한다면 매우 유리할 것으로 생각된다.

이에 著者は 補氣血·強筋骨·補益精髓·強壯腎陽하는 效能을 지니고 있는 鹿茸<sup>28)</sup>으로 藥鍼液을 만든 후, 最近에 電子工學과 生物學의 發展으로 개발된 cDNA microarray chip에 鹿茸藥鍼液을 處理한 群의 組織을 培養하여 관련된 遺傳子들의 發顯 樣相을 調查하고자 하였다.

본 실험에 使用한 cDNA microarray chip 방법은 1.8×1.8cm 면적의 유리 슬라이드 위에 수만개의 Expressed Sequence Tag(EST)를 심어 넣어 세포주나 조직에서 얻은 mRNA를 역전사하면서 각기 다른 형광물질을 가진 염기를 삽입하여 Cy3와 Cy5 probe를 만들고 같은 양을 cDNA array에 hybridization 시켜 發顯의 정도를 比較하는 方法이다<sup>23),24),27),29)</sup>. 이것은 상대적 신호의 차이를 검출하기 때문에 어떤 기준 유전자의 신호를 중심으로 측정하여야 하는데 본 연구에서도 다른 보고들<sup>3),15)</sup>과 같이 beta actin과 GAPDH를 기준으로 하였다. 총 3136개의 유전자 중 32개의 beta actin을 chip상에 골고루 분포시켜 기준으로 삼았는데 DNA chip 결과 총 3136개 遺傳子의 전체 R/G ratio의 분포는 최소 0.06에서 최고 2.06으로 나타났다. 正常組織에서 보

다 鹿茸藥鍼液 培養組織에서 發顯이 2배 이상(R/G ratio≥2) 增加된 遺傳子는 모두 3개로 이중 1개는 thioredoxin 遺傳子이고 나머지 2개는 새로운 遺傳子였으며, 약 2배 이상 발현이 增加한 transcription factor TFIIID-TAFII 31 遺傳子도 검색되었다. 반면 正常組織에서보다 鹿茸藥鍼液 培養組織에서 發顯이 2배 이상 減少된(R/G ratio≤0.5) 遺傳子는 모두 227개였으며, 이중 많은 遺傳子가 알려진 것들이었다.

본 研究에서 수행된 cDNA microarray assay는 최근 인간게놈프로젝트의 성공적인 수행 결과로 얻어진 것으로 엄청난 정보를 짧은 시간에 분석할 수 있는 새로운 방법이다. 鹿茸藥鍼液에 의해 增加되는 遺傳子로 thioredoxin과 TAFII 31이 검색되었다는 사실은 매우 의미있는 것이었다.

Thioredoxin은 여러가지 조건에서 생길 수 있는 radical을 탐식하여 抗酸化作用을 함으로서 老化를 遲延시킬 수 있는 蛋白質<sup>30)</sup>로 이는 鹿茸이 補氣血·強筋骨·補益精髓·強壯腎陽하는 效能이 있어 身體의 氣血을 補強하여 老化를 遲延시키는 作用을 示唆한다고 생각된다. 그리고 鹿茸藥鍼液에 의하여 減少하는 遺傳子들이 더욱 많은 것으로 볼 때 본 실험에서 사용된 鹿茸抽出液의 量이 過多하였거나 검액조제 방법상 세포에 radical을 많이 발생하게 하는 물질이 증가하여 세포의 방어작용의 하나로 thioredoxin이 增加되었을 가능성도 있다. 그러나 細胞 形態나 數의 인 면에서 鹿茸藥鍼液이 강한 독작용을 나타낸다는 증거는 없었다. 따라서 독작용에 의한 결과로 보기도 그 근거가 충분하지 않다.

TAFII 31<sup>31)</sup>는 전반적인 전사개시 단계에 중요한 전사인자로 잘 알려져 있는 遺傳子이며 본 실험에 사용한 DNA chip은 여러가지 전사개시 유전자들이 포함되어 있고 또한 일반적인 다른 전사인자들도 많이 포함되어 있으나, 여러가지 전사개시 유전자 중 하나의 유전자만 증가되는 것은 특이한 일이라



할 수 있다.

그리고 增加된 遺傳子 중 database에 알려져 있지 않은 2개 遺傳子の 염기서열을 가지고 BLAST<sup>32)</sup>에서 검색해 본 결과 지금까지 특별히 有意하게 相同性を 나타내는 遺傳子가 없었다. 이는 아직 염기서열이 보고되지 않은 새로운 遺傳子임을 나타낸다.

鹿茸藥鍼液에 의하여 減少된 遺傳子가 많았던 이유는 본 연구에서 확실히 알 수 없지만 형태학적 변화가 없는 범위에서 일어날 수 있는 세포의 독작용일 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 많은 遺傳子들이 細胞質에 있거나 分泌되는 遺傳子로 다양한 細胞作用을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 鹿茸藥鍼液에 骨形成 關聯 遺傳子外 많은 다른 細胞反應에 參與할 수 있는 物質들로 이루어져 있음을 나타낸다. 오히려 骨組織에 많은 여러가지 遺傳子들인 osteonectin, biglycan, type I collagen 등에는 큰 영향이 없었으며, 增加 또는 減少된 遺傳子들의 機能上 共通點을 알 수 없었다.

본 연구에서 수행된 DNA chip을 이용한 遺傳子 分析은 향후 다양한 분야에서 응용되면서 그 사용빈도가 엄청날 것으로 여겨지며, 특히 韓醫學과 西歐의 生命工學을 접목하는 새로운 시도는 유용한 많은 정보를 도출할 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 結 論

鹿茸藥鍼液의 遺傳子 發顯을 分析하고자 cDNA microarray chip을 이용하여 정상 骨細胞와 鹿茸藥鍼液으로 培養한 骨細胞의 試料에서 抽出한 mRNA를 hybridization시켜 두 조직간의 發顯量에 관한 정보로 關聯 遺傳子를 研究하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DNA chip을 이용한 遺傳子 發顯 分析은 正常組織에 비해 鹿茸藥鍼液 培養組織에서 두배 이상 增加된 遺傳子는 모두 3개로 그중 1개는 알려진 thio-redoxin이고 나머지 2개는 염기서열이 보고되지 않은 새로운 遺傳子였다.

2. 正常組織에 비해 鹿茸藥鍼液 培養組織에서 두배 이상 減少된 遺傳子는 모두 227개였다.

## IV. 參考文獻

1. Baron R, Vignery A, Horowitz M. Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling, In: Bone and Mineral Research, Peck, W. J. Elsevier, New York, 1984; 175-243.
2. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Robey PG, Boskey AL. Bone formation: Osteoblast lineage cells, growth factor, matrix proteins, and the mineralization process, 4th Ed. Favus MJ. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, U.S.A., 1999; 14-27.
3. Collins F, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. the members of the DOE and NIH planning groups. New goals for the U.S. human genome project: 1998-2003. Science, 1998; 282: 682-746.
4. 김정숙. 생약을 이용한 골다공증 치료제 개발 연구, 제1회 골다공증 연구회 심포지움 pro-

- ceeding, 1998 ; 32-6.
5. 姜成吉 外. 鹿茸藥針刺戟이 卵巢摘出 環귀의 脂質 및 骨代謝에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 1996 ; 17 : 168-77.
  6. 권대현 外. 黃精藥針液의 氣海投與가 環귀의 骨多孔症에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1998 ; 15(1) : 515-23.
  7. 송호섭 外. 腎俞에 黃精藥針液 投與가 卵巢摘出 環귀에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1998 ; 15(1) : 373-85.
  8. 韓相源, 李潤浩, 金昌煥. 鹿茸藥鍼이 卵巢摘出로 誘發된 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響, 大韓藥鍼學會誌, 2000 ; 3(1) : 177-91.
  9. 孫仁貴, 陳冠群. 實驗性骨折愈合의 走査電鏡觀察, 中華骨科雜誌, 1993 ; 13(2) : 114-6.
  10. 余希杰. 異名異沖制影響骨折愈合過程的組織學及X線定量研究, 中國中醫骨傷科雜誌, 1998 ; 6(3) : 11-3.
  11. 張劍宇, 李麗. 羊骨膠促進骨折愈合의 初步實驗, 中國骨傷, 1998 ; 11(3) : 20-2.
  12. 周正新, 李保泉, 曹日隆. 消瘀接骨散對骨折愈合相關生化指標的影響, 中國骨傷, 1998 ; 11(1) : 19-21.
  13. DeRisi JL, Penland L, Brown PO. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet*, 1996 ; 14 : 457-60.
  14. 金完熙, 金廣中. 臟象學의 理論과 臨床, 일증사, 서울, 1996 ; 54.
  15. Schluler GD. et al. A gene map of the human genome. *Science*, 1996 ; 274 : 540-6.
  16. Hedric S, Cohen DL, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T-cell specific membrane associated proteins. *Nature*, 1984 ; 308 : 149-51.
  17. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science*, 1992 ; 257 : 967-71.
  18. Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hagan BLM. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryoparietal endoderm is related to an endothelial cell "culture shock" glycoprotein of Mr. 43707. *EMBO J.*, 1986 ; 5 : 1465-70.
  19. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sanger R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 1992 ; 52 : 6966-8.
  20. Chen JJW. et al. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed gene by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*, 1998 ; 51 : 313-24.
  21. Guimararts MJ, Zlotnik A, McClanahan T. Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res*, 1993 ; 23 : 1832-3.
  22. Kurian K, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. *J Pathol*, 1999 ; 187 : 267-71.
  23. Sapolsky RJ, Lipshultz RJ, Mapping genomic library clones using oligonucleotide arrays. *Genomics*, 1996 ; 33 : 445-56.
  24. Wilgenbus KK, Lichter P. DNA chip technology ante portas. *J Mol Med*, 1999 ; 77 : 761-8.
  25. Gerhold D, Rushmore T, Caskey T. DNA

- chips : promising toys have become powerful tools. *TIBS*, 1999 ; 24 : 165-73.
26. Schena M, Davis RW. Technology standards for microarray research. Ed Schena M. *Microarray biochip technology*, Bio Techniques Books, Natick, MA, USA, 2000 ; 1-18.
27. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complimentary DNA microarray. *Science*, 1995 ; 270 : 467-70.
28. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著, 本草學, 서울, 영림사, 1991 ; 545-46.
29. Welford SM, Gregg J, Chen E, Garrison D, Sorensen PH, Denny CT, Nelson SF. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Research*, 1998 ; 26 : 3059-65.
30. Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 2000 ; 29 : 312-22.
31. Lu H, Levine AJ. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995 ; 92 : 5154-8.
32. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 1997 ; 25 : 3389-402.